

На правах рукописи

МИНУЛЛИНА РЕНАТА ТАВКИЛЕВНА

**ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Казань - 2014

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Фахруллин Равиль Фаридович

Официальные оппоненты:

- **Ившина Ирина Борисовна**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФБГОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», зав. лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (г. Пермь);

- **Куликов Сергей Николаевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и разработки аллергенов ФБУН "Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Казань).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный университет» (г. Астрахань).

Защита диссертации состоится «26» июня 2014 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д. 212.081.08 при ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория № 211. Телефон: +7 (843) 233-78-42

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «___»_____2014 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последнее время значительное внимание уделяется развитию и перспективам бионанотехнологий и возможностям их применения в различных отраслях человеческой деятельности. Установлено, что свойства наноматериалов принципиально отличаются от свойств более крупных частиц того же химического состава. В связи с этим, оценка безопасности наноматериалов должна стать приоритетным направлением (Schmid, *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2010). Это связано, прежде всего, с ожидаемой повсеместной распространенностью этих материалов и вероятностью воздействия на организм человека, как при непосредственном контакте, так и при проникновении через окружающую среду.

Нанотехнологии обещают большие возможности для разработки новых гибридных материалов, которые содержат в своем составе компоненты органической и неорганической природы. В качестве органического компонента зачастую используют живые клетки микроорганизмов, которые являются чувствительным элементом для оценки токсического влияния различных веществ и материалов. Так, например, клетки микроорганизмов, обладающие чувствительностью к гербицидам и генотоксинам, могут служить чувствительными компонентами электрохимических биосенсоров и микрофлюидных чипов для определения гербицидов и генотоксинов. Иммобилизация неорганических наноматериалов (углеродных нанотрубок и магнитных наночастиц оксида железа) на клеточную стенку таких микроорганизмов позволяет усилить электрохимический сигнал сенсоров (Zamaleeva, *Analytical Methods*, 2011), а также временно зафиксировать клетки в камерах микрофлюидных устройств (Zhang, *Microbial Biotechnology*, 2011). В последние годы внимание исследователей привлек глинистый минерал – галлуазит, который представляет собой многослойные нанотрубки с диаметром просвета около 50 нм. Биологическая совместимость и достаточно широкий просвет нанотрубок представляют идеальное сочетание для создания наноконтейнеров для хранения биологически активных веществ, таких как ферменты и антисептики, с функцией медленного высвобождения (Lvov, *Progress in Polymer Science*, 2013). Такие гибридные материалы могут служить основой для создания антисептических покрытий и наполнителей для лакокрасочной продукции, основным свойством которой является предотвращение роста плесневых грибов и бактериальных колоний (Abdullayev, *Journal of Materials Chemistry*, 2010; Levis, *International journal of pharmaceutics*, 2003).

На сегодняшний день опубликованы результаты исследований по изучению токсического влияния наноматериалов с использованием клеток микроорганизмов и культур клеток человека и животных, однако практически отсутствуют данные о влиянии наноматериалов на высокоразвитые многоклеточные организмы. Наноматериалы, попавшие в окружающую среду, в первую очередь взаимодействуют с одноклеточными микроорганизмами, которые являются одним из первых звеньев в пищевой цепи. Далее наноматериалы аккумулируются в организме консументов первого и второго порядка.

Таким образом, актуальным является разработка комплексного подхода для оценки токсического влияния наноматериалов на различных уровнях организации живого (клеточном и организменном).

Цель настоящей работы – разработать систему оценки токсичности нанотрубок галлуазита, серебряных и магнитных наночастиц и выявить их токсические эффекты по отношению к прокариотам и эукариотам.

Основные задачи исследования:

1. Определить характер взаимодействия серебряных и магнитных наночастиц с клеточной стенкой бактерий (*Escherichia coli*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и микроскопических водорослей (*Chlorella pyrenoidosa*).
2. Исследовать влияние наноматериалов на жизнеспособность модифицированных клеток.
3. Выявить оптимальные условия для формирования функционального материала с пролонгированным антисептическим действием на основе нанотрубок галлуазита и бриллиантового зеленого.
4. Исследовать токсическое влияние функциональных наноматериалов на основе нанотрубок галлуазита с потенциальным антибактериальным свойством на клетки грамположительных бактерий *S. aureus*.
5. Установить характер влияния модифицированных клеток микроорганизмов на нематоду *Caenorhabditis elegans*.

Научная новизна

В работе впервые предложен универсальный метод оценки токсического влияния магнитных и серебряных наночастиц с использованием свободноживущей почвенной нематоды *C. elegans* путем доставки наноматериалов в организм нематод посредством их иммобилизации на поверхности клеток микроорганизмов.

Показано, что наноматериалы аккумулируются в пищеварительном тракте *C. elegans* и оказывают значительное влияние на жизненные показатели нематод (рост, репродуктивный потенциал) в зависимости от природы исследуемого наноматериала.

Впервые были получены и охарактеризованы гибридные системы на основе нанотрубок галлуазита и антисептика бриллиантового зеленого. Были продемонстрированы антибактериальные свойства функциональных нанотрубок галлуазита и длительное выделение активного антисептика из просвета нанотрубок.

Практическая значимость

Разработанный метод оценки токсического влияния наноматериалов с использованием клеток микроорганизмов и многоклеточных организмов является дешевым, и поэтому может быть использован в качестве стандартного метода для тестирования биологической безопасности вновь полученных наноматериалов в производственных лабораториях.

Гибридные системы с антибактериальным действием на основе нанотрубок галлуазита могут быть использованы в качестве активного компонента для создания антисептических повязок, которые найдут свое применение в раневой хирургии и покрытий с антибактериальными свойствами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиаллиламин-стабилизированные магнитные наночастицы и многослойные полимерные пленки, содержащие цитрат-стабилизированные серебряные наночастицы, задерживают активное клеточное деление, но незначительно влияют на

эстеразную активность бактерий *E. coli* и дрожжей *S. cerevisiae* и фотосинтетическую способность водорослей *C. pyrenoidosa*.

2. Инкапсуляция антисептика бриллиантового зеленого в просвете нанотрубок галлуазита увеличивает время его полного высвобождения и повышает эффективность антисептического действия по отношению к грамположительным бактериям.
3. Использование наномодифицированных клеток-носителей, несущих на своей поверхности магнитные и серебряные наночастицы, позволяет осуществлять контролируемую доставку наноматериалов в организм многоклеточного модельного организма нематоды *C. elegans*. При этом серебряные наночастицы оказывают ингибирующий эффект на рост и размножение нематод, в то время как магнитные наночастицы являются биосовместимыми.

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены на X научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2011), IV Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия» (Воронеж, 2011), Всероссийском конкурсе НИР студентов и аспирантов в области химических наук и наук о материалах в рамках Всероссийского фестиваля науки (Казань, 2011), конкурсе научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского (Казань, 2012), конференции молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана» (Казань, 2012), Всероссийской молодежной научной школе «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности» (Казань, 2012), VI международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2012), 17-ой международной Пушкинская школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2013), VI всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз - Россия» (Иркутск, 2013), II Международной научной конференции для молодых ученых, студентов и школьников «Нanomатериалы и нанотехнологии: проблемы и перспективы» (Саратов, 2013).

Связь работы с научными программами. Работа была поддержана молодежным грантом РФФИ «Мой первый грант» (№ 12-04-32054 мол_а) и международным грантом РФФИ (№ 12-03-93939- G8_а), а также стипендией президента Российской Федерации на обучение за рубежом (приказ № 539 от 17.07.2012).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, включает 45 рисунков и 9 таблиц. Библиография включает 179 источников.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 5 статей в зарубежных изданиях, включенных в базу систем цитирования ISI Web of Science и Scopus, 1 статья в российском издании, включенном в список ВАК.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., доценту кафедры микробиологии Р.Ф. Фахруллину; д.б.н. Ишмухаметовой Д.Г. за постоянные консультации и помощь при подготовке материалов к публикации; профессору Технического университета Луизианы (США) Ю.М. Львову за представленную возможность выполнения части экспериментальной работы в лаборатории наносборки

Института микропроизводства (г. Растон, США); зарубежным коллегам доктору Правину Паттекари (Dr. Pravin Pattekari) и доктору Венбо Вей (Dr. Wenbo Wei), аспиранту Анупаму Джоши (Anupam Joshi) за помощь в освоении новых методов; сотрудникам и студентам лаборатории биоматериалов и наноматериалов КФУ Дзамуковой Марие, Фахруллиной Гульнур, Конновой Светлане, Наumenko Екатерине и Алсу Замалеевой за всестороннюю помощь при подготовке диссертации и ценные замечания. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской.

Особую благодарность автор выражает Joshua R. Tully, родителям Минуллиной Виталине Викторовне и Минуллину Тавкилю Баграмовичу, брату Минуллину Рустаму без которых диссертация не была бы написана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и их подготовка. В работе использовали дикий тип свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* штамм N2 Bristol, грамотрицательные бактерии *E. coli* штамм XL-10, грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* (ATCC® 49774), одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella pyrenoidosa*, культуру пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из музейной коллекции кафедры микробиологии.

Питательные среды и условия культивирования. Культивирование *E. coli* проводили на питательном агаре (Oxoid Microbiology products #CM0309), культивирование *S. aureus* проводили в триптон-соевом бульоне (Sigma-Aldrich #22091) при 37 °C, культивирование дрожжей *S. cerevisiae* осуществляли на среде Сабуро (Oxoid Microbiology products #CM0041) при 30°C. Одноклеточную зеленую водоросль *C. pyrenoidosa* выращивали в BBM (Bold's Basal Medium) минеральной среде (Bischoff, University of Texas, 1963) с постоянной аэрацией с режимом освещенности 12 часов «день» с последующей сменой 12 часов «ночь». Нематоду *C. elegans* культивировали на NGM (Nematode Growth Medium) (Brenner, Genetics, 1974).

Синтез и характеристика магнитных и серебряных наночастиц. Метод синтеза полимер-стабилизированных магнитных наночастиц основан на соосаждении ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} с последующей стабилизацией наночастиц молекулами полиаллиламина (15 кДа) (Garsia-Alonso, Biosensors and Bioelectronics, 2010). Метод синтеза цитрат-стабилизированных серебряных наночастиц основан на восстановлении ионов Ag^+ из нитрата серебра до металлического Ag^0 с последующей стабилизацией наночастиц цитрат-анионами (Pillai, The Journal of Physical Chemistry B, 2004). Размер и заряд полученных наночастиц исследовали методами динамического светорассеяния и лазерной вельосиметрии Доплера, которые реализованы в приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Также морфологию и распределение наноматериалов на поверхности клеток исследовали при помощи сканирующего электронного микроскопа Auriga (Carl Zeiss, Германия) и просвечивающего электронного микроскопа 1200 EX (Jeol, Япония).

Методы иммобилизации наночастиц на клеточную поверхность. Для покрытия клеток цитрат-стабилизированными серебряными наночастицами использовали метод послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов по методу Diaspro с соавт. (Diaspro, Langmuir, 2002). На первом этапе к осадку клеток микроорганизмов вносили раствор отрицательно заряженного полистирол сульфоната 1 мг/мл (PSS; 70 кДа, pK_a 7) и инкубировали при перемешивании в течение 15 минут при комнатной температуре. Это позволяет усилить природный отрицательный заряд клеточной поверхности (Lederer, Microbial Cell Factories, 2012). Затем осаждали клетки центрифугированием при 4000 об/мин (2 минуты) и отмывали от не

связавшегося полиэлектролита 2 раза дистиллированной водой. На следующем этапе повторяли процедуру покрытия положительно заряженным полиэлектролитом полиаллиламин гидрохлоридом (РАН; 15 кДа, рКа 8.8). Далее вносили суспензию отрицательно заряженных цитрат-стабилизированных серебряных наночастиц (0.1 мг/мл) и закрепляли наночастицы дополнительным бислоем РАН/PSS. Таким образом, финальная композиция многослойной пленки представляла собой *E.coli*/PSS/РАН/Ag НЧ/РАН/PSS. Для демонстрации иммобилизации слоев после каждого этапа покрытия отбирали аликвоты суспензии клеток и измеряли дзета-потенциал.

Иммобилизацию РАН-стабилизированных магнитных наночастиц (РАН-МНЧ) проводили путем внесения суспензии наночастиц (0.1 мг/мл) к осадку клеток и инкубировали в течение 15 минут при постоянном перемешивании. По истечении времени инкубации, отделяли магнетизированные клетки при помощи магнита, удаляли супернатант и промывали дистиллированной водой 2 раза тем же способом.

Оценка жизнеспособности наномодифицированных клеток. Жизнеспособность модифицированных клеток бактерий и дрожжей определяли методами витального окрашивания клеток флуоресцеин диацетатом (Green, Soil Biology & Biochemistry, 2006) и исследования динамики роста при помощи спектрофотометрического детектирования оптической плотности (ОП_{595nm}) клеточной культуры на планшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Жизнеспособность клеток водорослей *C. pyrenoidosa* определяли при помощи флуоресцентной микроскопии по автофлуоресценции хлорофилла b.

Оценка токсического влияния наномодифицированных клеток микроорганизмов с использованием нематоды *C. elegans*. Для экспериментов по изучению токсического воздействия наномодифицированных клеток использовали синхронную по возрасту культуру нематод, которую получали по методу Fabian (Fabian, Journal of gerontology, 1994) Первоначально помещали синхронизированные личинки L1 на свежие стерильные NGM чашки (100 червей/чашка Петри) Затем в качестве питательного субстрата добавляли суспензию клеток *E.coli*, модифицированных РАН-МНЧ или PSS/РАН/AgНЧ/РАН/PSS оболочками до конечной концентрации 10⁹ КОЕ/чашка. Контрольные условия – в качестве пищи вносили эквивалентное число немодифицированных клеток. После выращивания нематод в течение 48 ч (20°C) смывали тотальную популяцию нематод М9 буфером (22мМ КН₂РO₄, 42 мМ Na₂НРO₄, 85,5 мМ NaCl, 1 мМ MgSO₄) и подвергали температурной фиксации на кипящей водяной бане в течение 30 секунд. Далее фиксировали препараты раствором 2.5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере. При помощи оптической микроскопии подсчитывали количество яиц не менее чем у 100 беременных гермафродитных особей и измеряли длину тела. Распределение наномодифицированных микроорганизмов в организме нематод визуализировали методами оптической микроскопии (Axioscope A1, Carl Zeiss, Германия) и гиперспектральной темнопольной микроскопии (Cyto Viva®, США) Анализ полученных изображений проводили при помощи программного обеспечения Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Формирование функциональных нанотрубок галлуазита с антисептическими свойствами. 500 мг нанотрубок галлуазита добавляли в 10 мл ацетонового раствора бриллиантового зеленого (20 мг/мл), перемешивали и помещали в ультразвуковую баню на 30 минут (70 Вт), что позволило равномерно диспергировать агрегаты трубок в растворе красителя. Затем, помещали пробирку в вакуумную станцию на 30 минут, в результате чего воздух из просвета трубок замещался раствором антисептика. Инкубацию трубок под вакуумом повторяли 3 раза. Далее осаждали трубки центрифугированием при 5000g и промывали один раз 10 мл ацетона. На последнем этапе высушивали трубки в сушильном шкафу при 50°C. Для

формирования нанопокровтия, которое препятствует быстрому высвобождению антисептика, мы использовали метод формирования комплекса меди (II) и бензотриазола. Для этого последовательно промывали трубки растворами бензотриазола и сульфата меди (II), варьируя при этом молярное соотношение этих компонентов. Кинетику высвобождения бриллиантового зеленого из нанотрубок галлуазита изучали спектрофотометрическим методом при помощи сканирующего спектрофотометра Agilent 8453 (Agilent Technologies, США). Для этого нанотрубки суспендировали в воде и инкубировали при постоянном перемешивании в течение минимум 6 часов. Каждый час образцы центрифугировали и отбирали супернатант для последующего спектрофотометрического исследования. Затем добавляли свежую порцию воды и продолжали инкубацию. Максимум поглощения бриллиантового зеленого составлял при 625 нм. Полученные данные представляли в виде графика зависимости доли высвободившегося вещества от времени. Массовую долю органического вещества в препаратах нанотрубок детектировали при помощи термогравиметрического анализатора TGA Q50 (TA Instruments, США).

Антисептические свойства функциональных наноматериалов исследовали с использованием культуры грамположительной бактерии *S. aureus*. Стерильные препараты нанотрубок добавляли в триптон-соевый бульон (ТСБ), содержащий 10^6 КОЕ/мл *S. aureus*. Пробирки инкубировали в термощейкере при 37 °C в течение 24 часов. Затем отбирали аликвоту клеток и центрифугировали оставшийся в пробирке объем. Супернатант удаляли и добавляли свежий ТСБ. И продолжали инкубацию в течение следующих 24 часов. Замену питательной среды на новую и отбор аликвот для дальнейшего исследования проводили после 24, 48 и 72 часов инкубации с исследуемыми образцами. Отобранные аликвоты клеток промывали стерильным NaCl 0.9 %. и вносили 2.5 мкл флуоресцеин диацетата (10 мг/мл в ацетоне) затем измеряли интенсивность флуоресценции в черных непрозрачных планшетах с использованием флуоресцентного планшетного ридера FLx800 (Biotek, США) при 540 нм для флуоресцеин диацетата (возбуждение при 485 нм). Изначальное количество живых клеток в образцах рассчитывали по интенсивности флуоресценции с использованием калибровочной кривой.

Статистическая обработка результатов. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel. Для демонстрации разброса нематод по длине тела до и после кормления бактериями обработки наноматериалами мы использовали метод построения вариационных рядов (Лакин, М.: Высшая школа, 1990). Для проверки значимости различий между группами мы использовали метод построения доверительного интервала для выборочного среднего (Акберова, Казань: Изд-во Казанского государственного университета, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Модификация клеточной поверхности микроорганизмов магнитными и серебряными наночастицами и оценка их жизнеспособности

Объектами для иммобилизации наноматериалов послужили представители трех царств, а именно: Царство Растения (*C. pyrenoidosa*), Грибы (*S. cerevisiae*) и Бактерии (*E.coli*). Эти виды микроорганизмов окружены клеточной стенкой различного химического состава. Благодаря наличию заряженных молекул в составе клеточных стенок, поверхность клеток приобретает слабый отрицательный потенциал, что подтверждается данными по измерению дзета-потенциала нативных клеток в воде (Табл. 1). Нанесение многослойных полимерных пленок,

содержащих в своем составе цитрат-стабилизированные серебряные наночастицы, было продемонстрировано при помощи метода измерения ζ - потенциала клеток.

Табл. 1. Дзета-потенциал (ζ) клеточной поверхности исследуемых видов микроорганизмов в воде

Вид микроорганизма	ζ , мВ
<i>E.coli</i>	-31±2
<i>S. cerevisiae</i>	-13±1
<i>C. pyrenoidosa</i>	-29±4

График на рис. 1 демонстрирует последовательное изменение знака ζ - потенциала при нанесении пленки PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS на клеточную стенку бактерий *E.coli*. Предварительный слой отрицательно заряженного полиэлектролита PSS позволил усилить нативный отрицательный заряд клеток *E.coli*. При нанесении положительно заряженного PAH значение ζ - потенциала клеток становилось положительным (+51±2 мВ). Зигзагообразная форма графика свидетельствует об успешной иммобилизации противоположно заряженных полиэлектролитов и серебряных наночастиц.

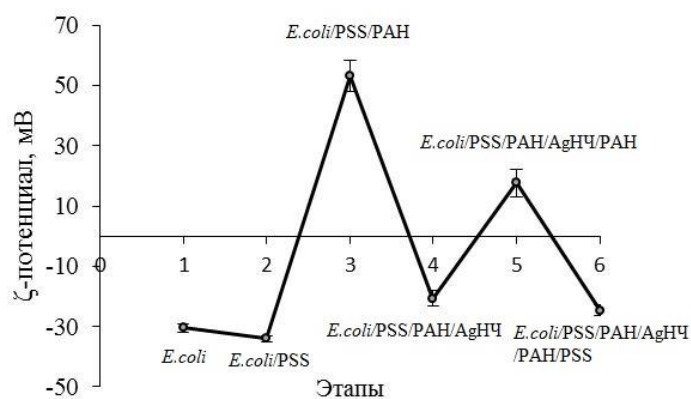


Рис. 1. Последовательное изменение значения ζ - потенциала клеток *E.coli* при покрытии их многослойной пленкой PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS. Количество измерений $n=3$.

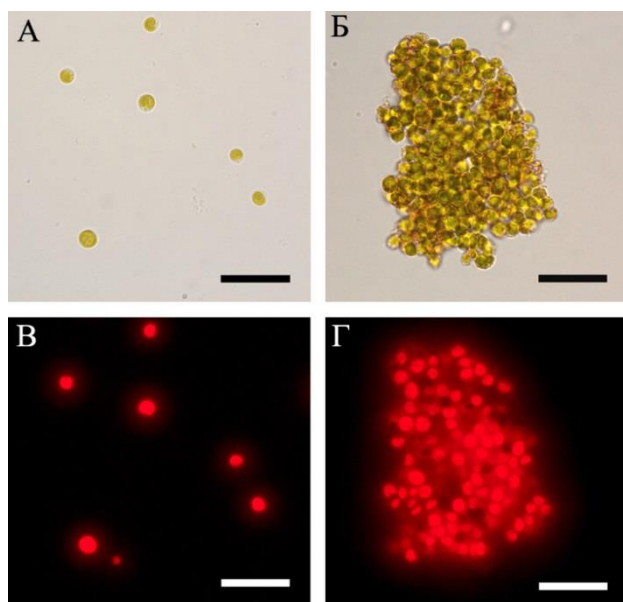


Рис. 2. Оптические микрофотографии клеток *C. pyrenoidosa*, модифицированных PAH-МНЧ в режиме светлого поля (А, Б) и режиме флуоресценции (В, Г). Клетки имеют тенденцию к агрегации при обработке их поверхности магнитными наночастицами. Шкала – 10 мкм

Клетки водорослей и дрожжей, покрытые РАН-МНЧ были охарактеризованы методом оптической микроскопии. Было продемонстрировано, что при нанесении РАН-МНЧ на поверхность клеток, все используемые клетки приобретали коричневое окрашивание и образовывали агрегаты (Рис. 2Б, 2Г), что является показателем иммобилизации магнитных наночастиц на клеточную стенку. Было показано, что интенсивность автофлуоресценции клеток *C. pyrenoidosa*, модифицированных РАН-МНЧ (Рис. 2Г), обусловленная эмиссией хлорофилла, не изменяется по сравнению с контрольными клетками (Рис. 2В) Таким образом, модификация клеточной стенки водорослей РАН-МНЧ не влияет на фотосинтетический аппарат клеток.

Модификация клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* при помощи РАН-МНЧ незначительно влияет на метаболическую активность клеток. Об этом свидетельствуют данные по эстеразной активности дрожжей, полученные при помощи окрашивания флуоресцеин диацетатом. Согласно полученным данным $84 \pm 3\%$ клеток сохраняют свою метаболическую активность, в то время как в контрольной суспензии дрожжей содержалось $90 \pm 5\%$ метаболически активных клеток. Типичные флуоресцентные микрофотографии представлены на рис. 3.

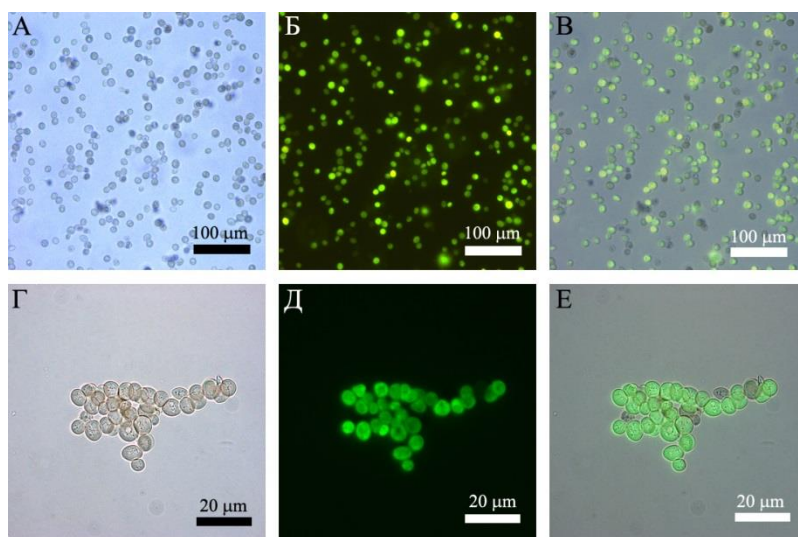


Рис. 3. Оценка эстеразной активности клеток *S. cerevisiae* при помощи флуоресцеин диацетата. Верхний ряд – контроль; нижний ряд – клетки, покрытые РАН-МНЧ. А, Г – светлое поле; Б, Д – режим флуоресценции; В, Е – наложение соответствующих полей зрения.

По результатам динамики роста бактерий *E. coli* (Рис. 4), модификация клеточной стенки РАН-МНЧ и многослойной полимерной пленкой PSS/РАН/AgНЧ/РАН/PSS увеличивает время лаг-фазы роста до 6 и 7 часов соответственно, что в 3 и 3.5 раз дольше по сравнению с контрольными клетками. Эти данные соответствуют ранее полученным данным по токсичности серебряных наночастиц (Sondi et al., Journal of colloid and interface science 2004). Авторы объяснили это тем, что серебряные наночастицы концентрируются в клеточной стенке бактерий, нарушая целостность клеточной мембраны и вызывая тем самым клеточную гибель. Явление удлинения лаг-фазы роста бактерий также можно объяснить тем, что для активного деления первоначально клеткам необходимо избавиться от плотного слоя наночастиц и полимеров на их поверхности. Это согласуется с ранее полученными данными (Konnova et al., Chem.Com., 2013). Было замечено, что характер роста клеток в экспоненциальную фазу роста не изменился по сравнению с контрольными клетками, что свидетельствует о сохранении

жизнеспособности бактериальных клеток, после нанесения на их поверхность многослойных пленок, содержащих серебряные наночастицы и формирования слоя магнитных наночастиц.

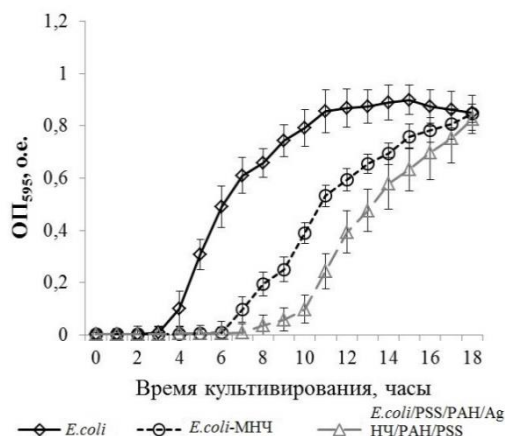


Рис. 4. Динамика роста клеток *E. coli*, *E. coli*, покрытых многослойной полимерной пленкой PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS и *E. coli* покрытых PAH-МНЧ.

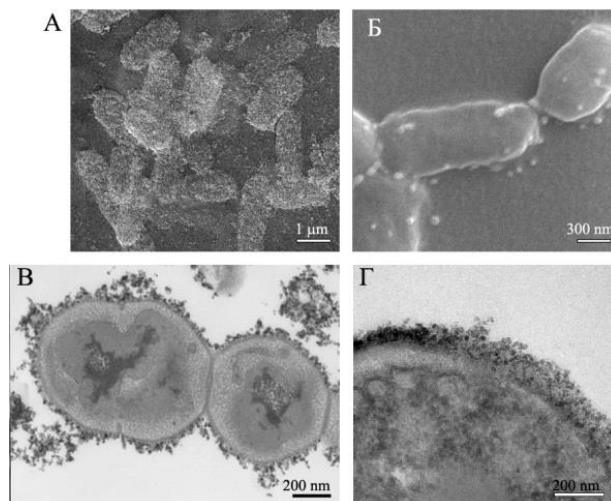


Рис. 5. Типичные сканирующие электронные изображения клеток бактерий *E. coli*, модифицированных PAH-МНЧ (А) и PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS (Б). Просвечивающие электронные микрофотографии клеток водоросли *C. pyrenoidosa* (В) и дрожжей *S. cerevisiae* (Г), модифицированных PAH-МНЧ

Более детальную характеристику распределения наноматериалов на поверхности клеточной стенки микроорганизмов проводили при помощи методов сканирующей и просвечивающей микроскопии. Магнитные наночастицы PAH-МНЧ образуют равномерный слой на клеточной *E. coli* (Рис. 5А), *C. pyrenoidosa* (Рис. 5В), и *S. cerevisiae* (Рис. 5Г), в то время как серебряные наночастицы обладают меньшим сродством к клеточной стенке *E. coli* (Рис. 5Б).

Таким образом, установлено, что при иммобилизации PAH-МНЧ на клетки бактерий, одноклеточных водорослей и дрожжей образуется плотный слой из наночастиц, который задерживает деление клеток, но незначительно влияет на физиологические показатели клеток (метаболическую активность и фотосинтез).

2. Изучение токсического влияния функциональных наноматериалов на основе нанотрубок галлуазита с пролонгированным антисептическим действием

Галлуазит представляет собой алюмосиликатные трубки с диаметром до 50 нм и достигающие 1 мкм в длину. Трубочатое строение галлуазита способствует формированию капиллярных сил, что позволяет загружать и удерживать в полости трубок различные химические вещества (Abdullayev et al., 2009). Было замечено, что вещества, загруженные в просвет нанотрубок, очень медленно высвобождаются. Для изучения кинетики высвобождения антисептика мы использовали краситель, бриллиантовый зеленый (БЗ). Раствор обладает интенсивной окраской, что значительно облегчило исследование релиза красителя из полученных образцов при помощи спектроскопии в видимой области спектра. Регулировать эффективность загрузки и высвобождения активных веществ из просвета трубок возможно различными способами. Совместно с американскими коллегами нами впервые был предложен способ формирования защитных покрытий на поверхности трубок на основе нерастворимого

комплекса бензотриазол-медь, которые предотвращают быстрое высвобождение бриллиантового зеленого (Рис. 6).

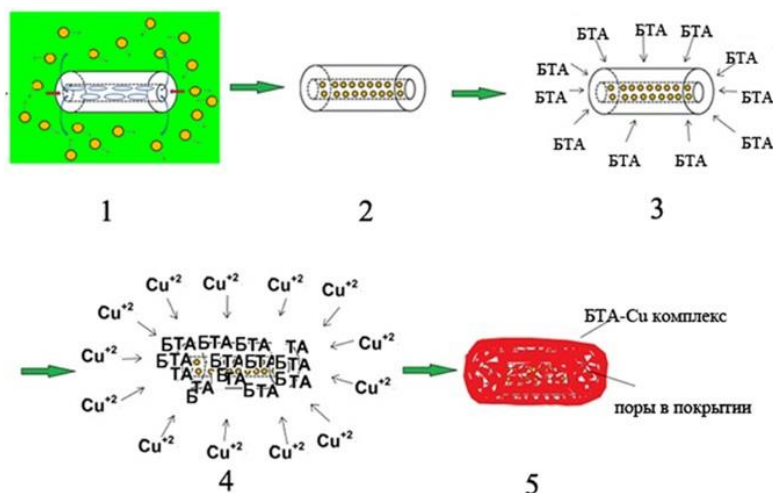


Рис. 6. Механизм формирования комплекса бензотриазол-медь (БТА-Си) комплекса на поверхности нанотрубок 1 – загрузка активного вещества при помощи вакуума 2 – высушенные трубки с активным веществом внутри 3 – обработка трубок раствором бензотриазола (БТА) 4 – обработка трубок раствором CuSO_4 5 – сформированный пористый БТА-Си комплекс на поверхности трубок

Первоначально исследовали кинетику растворения БЗ из трех образцов: 1) микрокристаллы БЗ 2) нанотрубки галлуазита, содержащие БЗ 3) нанотрубки галлуазита, содержащие БЗ, инкапсулированные в БТА-Си комплекс (Рис. 7). Все образцы содержали эквивалентное количество активного вещества – 660 мкМ.

Из рис. 7 видно, что скорость высвобождения красителя, загруженного в трубки, значительно снижается по сравнению со скоростью растворения свободного красителя (время полного растворения БЗ составило 20 минут). В то время, как только 5% загруженного красителя высвобождалось из трубок, покрытых БТА-Си комплексом.

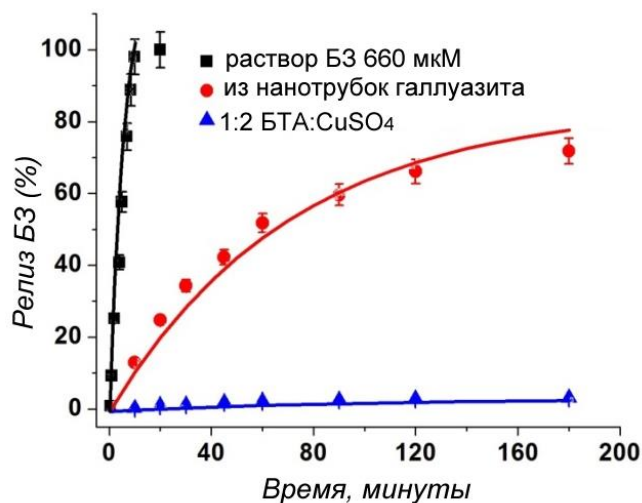


Рис. 7. Кинетика растворения кристаллов бриллиантового зеленого в воде (черная линия) по сравнению с длительным высвобождением молекул из нанотрубок галлуазита, покрытых БТА-Си комплексом (синяя линия) и непокрытых (красная линия)

Термогравиметрический анализ образцов позволил выявить процентное соотношение компонентов, входящих в состав композитных наноматериалов. Графики имеют участки потери массы, которые связаны с различными событиями, происходящими при нагревании образца (Рис. 8). Первый процесс происходит в диапазоне температур 25-150 °С. Это связано с испарением воды с поверхности нанотрубок. Вторая потеря массы (180-300 °С) связана с термическим разложением бриллиантового зеленого. Третья потеря массы при 400-550 °С связана с испарением молекул воды, которые располагаются в межслоевом пространстве (Cavallaro, Langmuir, 2011).

График потери массы в образце нанотрубок галлуазит-БЗ имеет двухступенчатую потерю массы. Участок графика в районе 0-100 °С соответствует испарению незначительного количества

молекулярной воды, которая содержится в любых образцах галлуазита. Резкое падение массы на 6.3 % от начальной массы в районе 200-280 °С можно объяснить температурным разложением бриллиантового зеленого, в то время как падение массы в области 400-500 °С является характеристической областью температурного разложения галлуазита. Таким образом, можно утверждать, что исследуемый образец нанотрубок, загруженных бриллиантовым зеленым, содержал 6.3% бриллиантового зеленого от общей массы образца. Полученные данные согласуются с данными кривых высвобождения бриллиантового зеленого (Рис. 8).

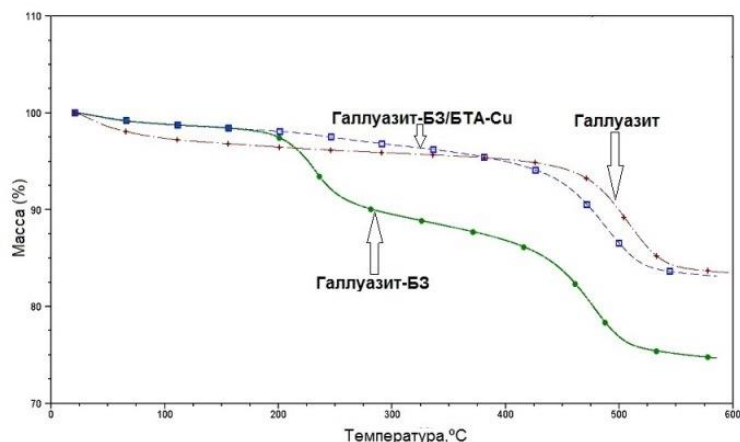


Рис. 8. ТГА-кривые нанотрубок галлуазита, галлуазита-БЗ и галлуазита БЗ, покрытого комплексом БТА-Си

График потери массы в образце нанотрубок, покрытых БТА-Си, внешне схож с графиком «пустых» нанотрубок галлуазита, имеет пролонгированный скос от 0 до 430 °С и резкое падение массы на 10% в районе 400-500 °С, что соответствует разложению галлуазита как и в предыдущем образце. Пролонгированное уменьшение массы можно объяснить тем, что комплекс БТА-Си имеет более высокую точку плавления по сравнению с точкой плавления бриллиантового зеленого, не позволяя плавиться и испаряться красителю, заключенному внутри трубок.

Из экспериментов по релизу БЗ была рассчитана эффективность загрузки образцов. Для трубок, покрытых БТА- Си оболочками значения эффективности загрузки находятся в диапазоне 6.5-15.8 % (масс.), что значительно выше по сравнению с эффективностью загрузки без использования комплексного покрытия – 3% (масс.).

Было показано, что молярное соотношение бензотриазола и CuSO_4 влияет на кинетику высвобождения бриллиантового зеленого из просвета нанотрубок. Рис. 9 представляет профиль высвобождения бриллиантового зеленого при различных условиях формирования БТА-Си оболочки. Было показано, что уменьшение молярного соотношения БТА и CuSO_4 при формировании покрытия замедляет скорость высвобождения бриллиантового зеленого (Рис. 9А). Вероятно, при высокой концентрации бензотриазола в результате формируется более пористое покрытие, которое способствует более быстрому высвобождению бриллиантового зеленого. В качестве контрольного эксперимента мы применили методику формирования БТА-Си покрытия на поверхности микрокристаллов бриллиантового зеленого. Полученные гибридные кристаллы затем растворяли в воде. Рис. 9В демонстрирует, что такие кристаллы растворяются в воде в течение 10 минут, что доказывает необходимость использования нанотрубок галлуазита для достижения эффекта пролонгированного высвобождения активного вещества.

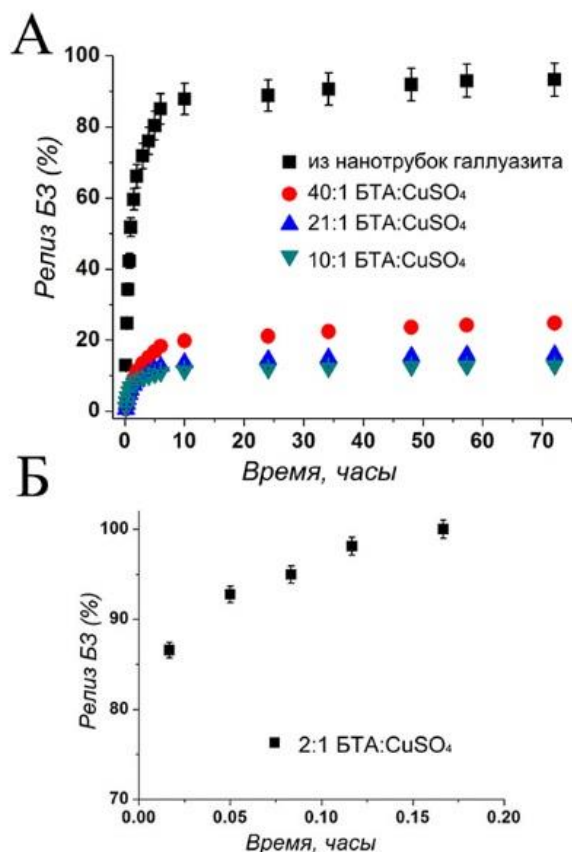


Рис. 9. Профили высвобождения бриллиантового зеленого из нанотрубок с различными условиями формирования БТА-Си комплекса. А – при различном молярном соотношении БТА и CuSO_4 ; Б – профиль растворения кристаллов бриллиантового зеленого после их инкапсуляции в БТА-Си комплекс (полное растворение происходит в течение 15 минут)

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что два основных фактора влияют на скорость высвобождения бриллиантового зеленого: пористость покрытия БТА-Си и эффективность загрузки активного вещества. Оба фактора определяются концентрацией Cu^{2+} и БТА. Эффективность загрузки увеличивается из-за ускоренного формирования покрытия, предотвращая тем самым потерю уже загруженного красителя. Высокая концентрация компонентов покрытия приводит к формированию плотной оболочки вокруг отдельной нанотрубки, приводя к снижению скорости высвобождения активного вещества.

Краситель бриллиантовый зеленый обладает выраженным бактерицидным свойством против грамм положительных бактерий. В связи с этим в качестве модельного организма мы выбрали культуру *S. aureus* (ATCC[®] 49774).

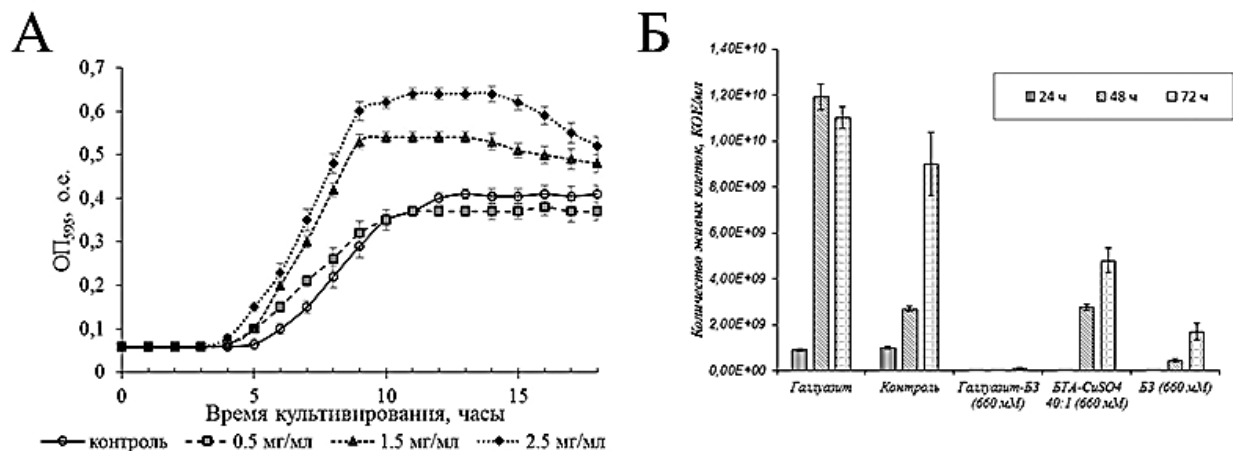


Рис. 10. А – Динамика роста клеток *S. aureus* в присутствии различных концентраций нанотрубок галлуазита; Б – Динамика количества живых клеток *S. aureus* обработанных нанотрубками галлуазита, содержащими бриллиантовый зеленый. Контроль – необработанные клетки. БЗ – эквимольное количество бриллиантового зеленого.

Исследование кинетики роста *S. aureus* в присутствии незагруженных («пустых») нанотрубок галлуазита показало, что галлуазит является биосовместимым наноматериалом.

Кроме того, галлуазит в концентрации 1.5 и 2.5 мг/мл ускорял логарифмическую фазу роста клеток. (Рис. 10А)

Для оценки антисептических свойств нанотрубок, загруженных бриллиантовым зеленым мы выбрали загруженные трубки без покрытия и трубки, инкапсулированные в БТА-Си комплекс с молярным соотношением 40:1, которые демонстрировали стабильное высвобождение 20% бриллиантового зеленого в течение 50 часов (Рис. 9А).

Согласно полученным результатам нанотрубки галлуазита, содержащие 660 мкМ бриллиантового зеленого (Галлуазит-БЗ) подавляют рост бактерий в течение 72 часов. (Рис. 10Б). Эквивалентное количество бриллиантового зеленого подавляло рост бактерий в течение первых 24 часов эксперимента, после чего бактерии продолжали расти. Было замечено, что галлуазит, покрытый БТА-Си оболочкой (40:1), подавляет рост микроорганизмов эффективнее по сравнению с контролем и «пустыми» нанотрубками. Более того, было отмечено, что в течение первых 24 часов, бактерии метаболизируют свободную форму красителя в лейко форму в то время как среда, содержащая загруженные нанотрубки галлуазита сохраняли зеленое окрашивание на протяжении 72 часов. Предыдущие исследование показали, что ингибирующий эффект проявляет лишь окрашенная форма бриллиантового зеленого (Moats et al., Appl. Environ. Microbiol., 1974 Singh et al., Ecological Engineering, 2012).

Таким образом, установлено, что нанотрубки глинистого минерала галлуазит являются биосовместимыми и могут быть использованы в качестве контейнеров для хранения антисептических и антибактериальных веществ. Комплексное БТА-Си на поверхности загруженных нанотрубок замедляет высвобождение бриллиантового зеленого. Бриллиантовый зеленый, инкапсулированный в просвет нанотрубок галлуазита, обладает пролонгированным антисептическим действием по отношению к грамположительной бактерии *S. aureus*. Это связано с постепенным высвобождением активного вещества из просвета трубок.

3. Токсическое влияние наномодифицированных клеток микроорганизмов на нематоду *C. elegans*.

Было установлено, что нематода *C. elegans* питается клетками водорослей, дрожжей и бактерий, поверхность которых модифицирована РАН-МНЧ и AgНЧ. В результате инкубации нематод в присутствии наномодифицированных клеток микроорганизмов наблюдали захват и распределение магнитных и серебряных наночастиц в пищеварительной системе (Рис. 11). При помощи гиперспектральной системы Cyto Viva[®] были получены микрофотографии нематод в режиме темного поля, где также видны скопления РАН-МНЧ (Рис. 12Б) и Ag НЧ (Рис. 12В) вдоль пищеварительной трубки.



Рис. 11. Оптическая микрофотография взрослой особи *C. elegans*. Демонстрирует распределение РАН-МНЧ в пищеварительном тракте нематоды.

Наиболее детально распределение магнитных наночастиц внутри пищеварительного тракта позволили рассмотреть просвечивающие электронные микрофотографии (Рис. 12). Рисунок демонстрирует поперечный срез тела нематод, которые инкубировались совместно с клетками *E.coli*/РАН-МНЧ (Рис. 12Б).

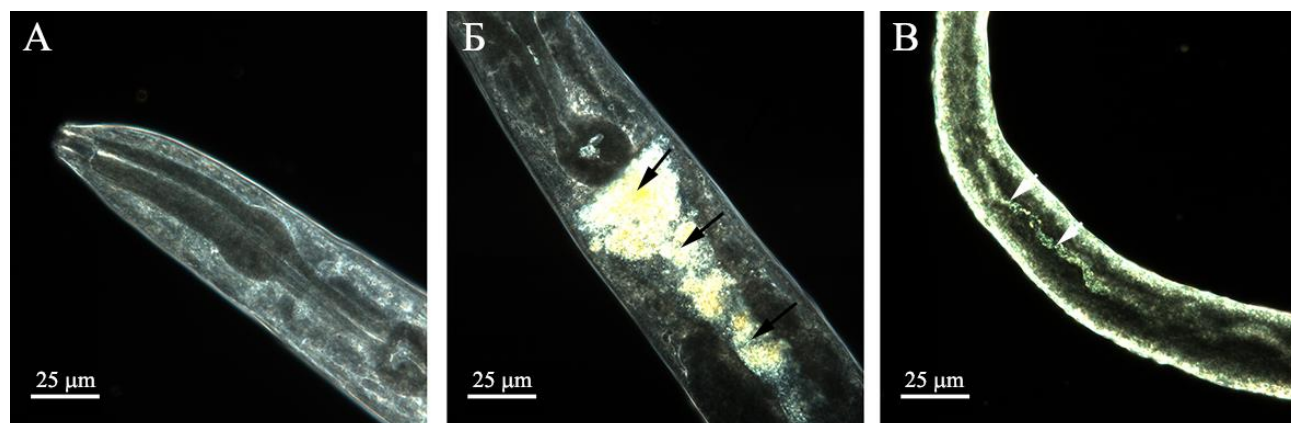


Рис. 12. Темнопольные микрофотографии нематод с наночастицами в пищеварительном тракте: А – контроль; Б – РАН-МНЧ; В – AgНЧ. Локализация наночастиц указана стрелками.

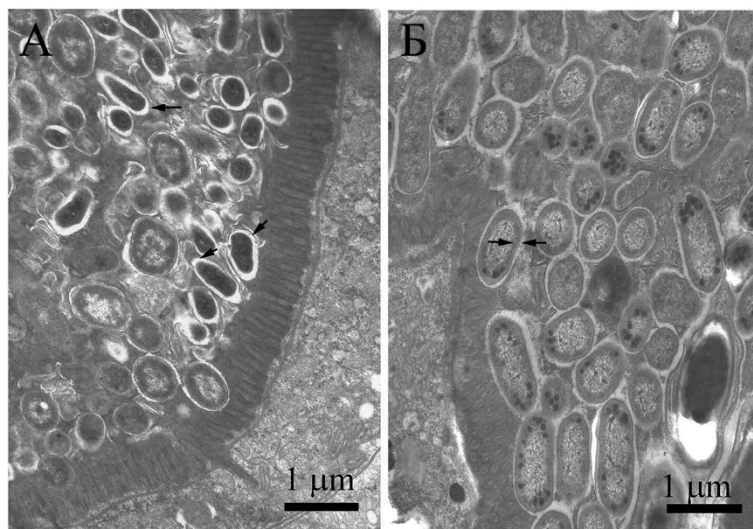


Рис. 13. Просвечивающие электронные микрофотографии тонких поперечных срезов тела нематоды *C. elegans*. А – Клетки *E.coli* в кишечной полости; Б – Клетки *E.coli*/РАН-МНЧ в кишечной полости. Клеточная стенка бактерий отмечена стрелками

Клетки *E.coli*/РАН-МНЧ обладают более толстой оптически плотной клеточной стенкой за счет иммобилизованных магнитных наночастиц на их поверхности (Рис. 13Б, отмечено стрелками) с то время как клетки с немодифицированной поверхностью обладают тонкой и частично разрушенной клеточной стенкой (Рис. 13А, отмечено стрелками). Как модифицированные, так и немодифицированные клетки взаимодействуют с микроворсинками кишечника нематод и подвергаются дальнейшему перевариванию в кишечной полости. Можно предположить, что наномодифицированные клетки перевариваются медленнее из-за наличия дополнительного плотного слоя наночастиц на их поверхности.

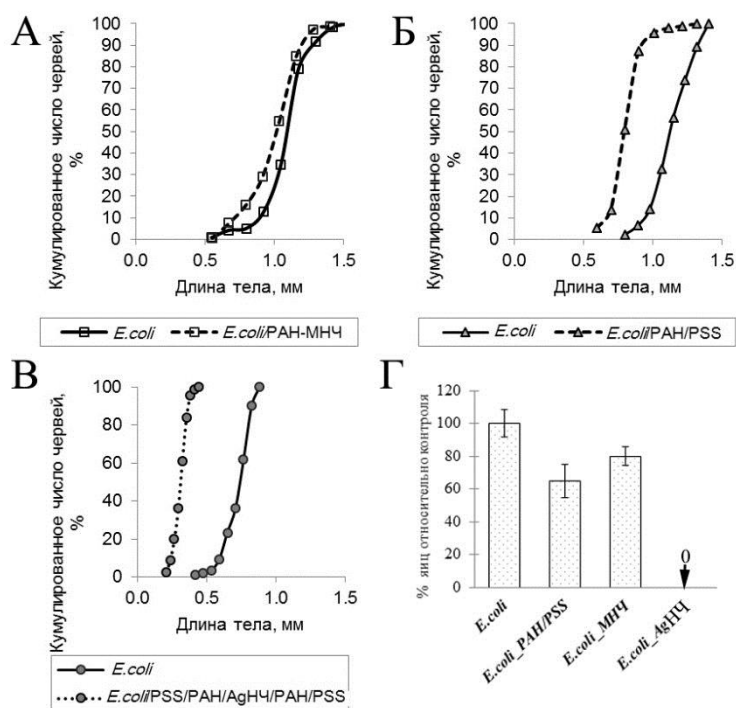


Рис. 14. Длина тела нематод, выращенных в присутствии *E. coli*/PAH-MHЧ (А); *E. coli*/PAH/PSS (Б); *E. coli*/PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS (В). Контроль – нематоды, выращенные в присутствии клеток *E. coli*; (Г) Доля количества яиц от контроля. Контроль – нематоды, выращенные в присутствии немодифицированных клеток *E. coli* ($n=306$); *E. coli*_PAH/PSS ($n=96$); *E. coli*_MHЧ ($n=104$) = *E. coli*/PAH-MHЧ; *E. coli*_AgHЧ = *E. coli*/PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS ($n=0^*$).

Исследование влияния наномодифицированных бактерий *E. coli* на размножение нематод показали, что в результате культивирования *C. elegans* с клетками *E. coli*, покрытыми PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS нематоды не развивались до стадии половозрелой особи. Полученные данные о токсичности серебряных наночастиц по отношению к *C. elegans* согласуются с данными литературы (Roh et al., Environmental science & technology, 2009; Lim et al., Environmental Toxicology and Chemistry, 2012). Стоит отметить, что кормление нематод *E. coli*, покрытыми бислоем PAH/PSS снижает репродуктивный потенциал нематод, но не в такой значительной степени, как клетки, имеющие на своей поверхности серебряные наночастицы. Наименьший токсический эффект оказывали клетки покрытые магнитными наночастицами (*E. coli*_MHЧ) (Рис. 14Г).

Результаты исследования роста нематод в присутствии наномодифицированных клеток показали, что *E. coli*, покрытые PSS/PAH/AgHЧ/PAH/PSS оказывают наибольший ингибирующий эффект по сравнению с контрольными клетками. Клетки обработанные PAH-MHЧ влияют на рост нематод незначительно, в то время как клетки, покрытые PAH/PSS бислоем оказывают слабый ингибирующий эффект (Рис. 14 А-В).

Таким образом, установлено, что PAH-стабилизированные магнитные наночастицы и цитрат стабилизированные наночастицы проникают в организм свободноживущей нематоды *C. elegans* совместно с клетками бактерий, дрожжей и водорослей. Серебряные наночастицы оказывают ингибирующий эффект на рост и размножение нематод, в то время как магнитные наночастицы являются биосовместимыми.

ВЫВОДЫ:

1. Установлено, что при иммобилизации РАН-МНЧ на клетки бактерий, одноклеточных водорослей и дрожжей образуется плотный слой из наночастиц, в то время как серебряные наночастицы располагаются на поверхности клеток диффузно.
2. Полимерная пленка на поверхности клеток *E. coli*, состоящая из PSS/РАН/Ag НЧ/РАН/PSS, и оболочка из РАН-МНЧ задерживают деление клеток, но незначительно влияют на их ферментативную активность.
3. Показано, что загрузка красителя бриллиантового зеленого в просвет нанотрубок галлуазита увеличивает время полного растворения красителя до 80 часов. Формирование на поверхности загруженных нанотрубок нерастворимого комплекса БТА-Cu приводит к увеличению времени растворения бриллиантового зеленого, либо к полной его задержке.
4. Нанотрубки галлуазита, содержащие 660 мкМ бриллиантового зеленого, подавляют рост *S. aureus* в течение 72 часов, в то время как эквимоллярное количество бриллиантового зеленого подавляет рост бактерий в течение первых 24 часов эксперимента.
5. Впервые установлено, что РАН-МНЧ наночастицы и Ag НЧ проникают в организм свободноживущей нематоды *C. elegans* совместно с клетками микроорганизмов-носителей. Серебряные наночастицы оказывают ингибирующий эффект на рост и размножение нематод, в то время как магнитные наночастицы являются биосовместимыми.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Wei, W. Enhanced efficiency of antiseptics with sustained release from clay nanotubes / W. Wei, **R. Minullina**, E. Abdullayev, R. Fakhrullin, D. Mills, Y. Lvov / RSC Advances. – 2014. – V. 4. – P. 488-494 – (перечень ВАК), Импакт-фактор – 2.562, автора – 0.3 пл.
2. Däwlätšina, G.I. Microworms swallow the nanobait: the use of nanocoated microbial cells for the direct delivery of nanoparticles into *Caenorhabditis elegans* / G.I. Däwlätšina¹, **R.T. Minullina**¹, R.F. Fakhrullin // Nanoscale. – 2013. – V. 5. – P. 11761-11769 – (перечень ВАК), Импакт-фактор – 6.233, автора – 0.4 пл.
3. Fakhrullin, R.F. Cyborg cells: functionalisation of living cells with polymers and nanomaterials / R.F. Fakhrullin, A.I. Zamaleeva, **R.T. Minullina**, S.A. Konnova, V.N. Paunov // Chemical Society Reviews. – 2012. – V. 41. – P. 4189-4206 – (перечень ВАК), Импакт-фактор – 24.892, автора – 0.8 пл.
4. **Minullina, R.T.** Interfacing multicellular organisms with polyelectrolyte shells and nanoparticles: a *Caenorhabditis elegans* study / R.T. Minullina, Y.N. Osin, D.G. Ishmukhametova, R.F. Fakhrullin // Langmuir. – 2011. – V. 27. – P. 7708–7713 – (перечень ВАК), Импакт-фактор – 4.186, автора – 0.3 пл.
5. **Минуллина, Р.Т.** *Caenorhabditis elegans* в токсикологии и нанотоксикологии / Р.Т. Минуллина, Р.Ф. Фахруллин, Д.Г. Ишмухаметова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2012. - № 2. – С. 172-182 – (перечень ВАК), автора – 0.5 пл.
6. **Минуллина, Р.Т.** Гибридные системы на основе живых организмов, полимеров и наночастиц / Р.Т. Минуллина, С.А. Коннова, М.Р. Дзамукова, И.Р. Шарипова, А.И. Замалеева, Д.Г. Ишмухаметова, О.Н. Ильинская, Р.Ф. Фахруллин // Обзорный журнал по химии. – 2012. –

Т. 2. – С. 319-333, автора – 0.6 пл. (переведена на английский и опубликована издательством Springer*)

*Minullina, R.T. Hybrid systems based on living organisms, polymers, and nanoparticles / R.T. Minullina, S.A. Konnova, M.R. Dзамukova, I.R. Sharipova, A.I. Zamaleeva, D.G. Ishmuchametova, O.N. Ilinskaya, R.F. Fakhrullin // Rev. Jour. Chem. – 2012. – V. 2. – № 4. – P. 315–328

7. **Минуллина, Р.Т.** Метод модификации поверхности многоклеточного организма (*Caenorhabditis elegans*) наноматериалами / Р.Т. Минуллина, Ю.Н. Осин, Р.Ф. Фахруллин // Материалы X научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». Казань: 2011. – С. 64.

8. **Минуллина, Р.Т.** Влияние полимер-стабилизированных магнитных наночастиц на организм нематоды *Caenorhabditis elegans* / Р.Т. Минуллина, Ю.Н. Осин, Д.Г. Ишмухаметова, Р.Ф. Фахруллин // Материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2011». Воронеж: 2011. – С. 148-150.

9. **Минуллина, Р.Т.** Полимер-опосредованная иммобилизация магнитных наночастиц на поверхности многоклеточных организмов / Р.Т. Минуллина // Сборник научных работ победителей Всероссийского конкурса НИР студентов и аспирантов в области химических наук и наук о материалах в рамках Всероссийского фестиваля науки. Казань: 2011. – С. 270-279.

10. **Минуллина, Р.Т.** Магнитные нематоды: новый класс гибридных систем для оценки токсичности / Р.Т. Минуллина, Е.М. Максимова, Р.Ф. Фахруллин // Сборник материалов Открытого конкурса научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского. Казань: 2012. – С.48.

11. Максимова Е.М. Токсическое воздействие декстран-стабилизированных магнитных наночастиц на нематоду *Caenorhabditis elegans* / Е.М. Максимова, **Р.Т. Минуллина**, Д.Г. Ишмухаметова, Р.Ф. Фахруллин // Сборник тезисов докладов Всероссийской молодежной научной школы «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности». Казань: 2012. – С. 42.

12. **Минуллина, Р.Т.** Магнитно-модифицированные нематоды *Caenorhabditis elegans* / Р.Т. Минуллина, Е.М. Максимова, Д.Г. Ишмухаметова, Ю.Н. Осин, Р.Ф. Фахруллин // Сборник тезисов 6 международной конференции «Современные достижения бионаноскопии», Москва: 2012. – С. 39.

13. Давлетшина, Г.И. Скрининг токсичности наноматериалов с использованием нематоды *Caenorhabditis elegans* / Г.И. Давлетшина, **Р.Т. Минуллина**, Р.Ф. Фахруллин // Сборник материалов конференции молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана». Казань: 2012. – С. 97-98.

14. Давлетшина, Г.И. Скрининг токсичности наноматериалов с использованием почвенных нематод / Г.И. Давлетшина, **Р.Т. Минуллина**, Р.Ф. Фахруллин // Материалы 17-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино: 2013 – С.586.

15. Давлетшина, Г.И. Разработка методов оценки токсичности наноматериалов с использованием почвенных нематод *Caenorhabditis elegans* / Г.И. Давлетшина, **Р.Т.**

Минуллина, Р.Ф. Фахруллин// Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз - Россия 2013». Иркутск: 2013. – С.69-71.

16. Давлетшина, Г.И. Новый метод оценки токсичности наноматериалов с использованием почвенных нематод / Г.И. Давлетшина, **Р.Т. Минуллина** // Сборник материалов II Международной заочной научной конференции для молодых ученых, студентов и школьников «Наноматериалы и нанотехнологии: проблемы и перспективы», Саратов: 2013. – С. 250-253.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

BBM – Базальная среда Болда

NGM – агаризованная среда для выращивания нематод

РАН – полиаллиламин гидрохлорид

PSS – полистирол сульфонат

Ag НЧ – цитрат-стабилизированные серебряные наночастицы

РАН-МНЧ – магнитные наночастицы, стабилизированные полиаллиламин гидрохлоридом

БТА – бензотриазол

БЗ – бриллиантовый зеленый

БТА-Сu – нерастворимый в воде комплекс бензотриазола и Cu^{2+}

ТГА – термогравиметрический анализ

Е-mail автора: mirenata1612@gmail.com

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание КФУ, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д. 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: ziabramova@mail.ru